

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Josip Kerkez**

**TOKSIČNOST EKSTRAKATA INVAZIVNIH TROPSKIH ALGI**  
**RODA *Caulerpa***

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2019.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom znanstvenog savjetnika dr. sc. Tvrtka Smitala i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALA

Istraživački dio ovog rada financiran je sredstvima projekta Hrvatske naklade za znanost (HRZZ), br. projekta 4806, te sredstvima SCOPES projekta financiranim od strane Švicarske Nacionalne naklade za znanost (SNSF), br. projekta SCOPES - IZ73ZO\_152274/1.

Zahvalio bih se članovima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju, Instituta Ruđer Bošković na omogućavanju izrade ovog diplomskog rada te na iskazanoj ljubaznosti, razumijevanju i strpljenju kojeg sam siguran da je bilo potrebno mnogo.

Ponajprije se zahvaljujem mentoru dr. sc. Tvrtku Smitalu na omogućavanju ovog diplomskog rada, dr. sc. Sandri Radić Brkanac na svoj njezinoj pomoći, dr.sc. Petri Marić koja je sa mnom imala više strpljenja nego što sam zaslužio, te dragim prijateljima Matei Rubinić i Antoniu Svorenji, znate što ste napravili... Od svih vas sam puno naučio te bez vas ovaj diplomski rad ne bi bio moguć.

Od srca vam hvala!

Josip Kerkez

# **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **TOKSIČNOST EKSTRAKTA INVAZIVNIH TROPSKIH ALGI RODA *Caulerpa***

Josip Kerkez

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb Hrvatska

Invazivno širenje morskih algi roda *Caulerpa* ima štetan učinak na veliki broj autohtonih vrsta i dovodi do drastičnog smanjenja bioraznolikosti, osobito suzbijanjem rasta bentoskih zajednica morskih cvjetnica. Pored tjelesne građe i načina razmnožavanja, svoju sposobnost širenja vrste algi roda *Caulerpa* vjerojatno postižu i odbijanjem ostalih morskih vrsta proizvodnjom toksičnih sekundarnih metabolita. Primjerice, kaulerpenin je acetilenski seskviterpen, koji je prisutan u značajnim količinama kod obje invazivne vrste roda *Caulerpa* koje nalazimo u Mediteranu, pa tako i u Jadranskom moru. Ispitivanjem toksičnosti ekstrakata ovih invazivnih vrsta algi korištenjem različitih biotestova, moguće je testirati ovu hipotezu te procijeniti njihovu potencijalnu štetnost za ostale morske vrste.

Cilj ovog istraživanja je odrediti toksični učinak ekstrakata uzoraka algi roda *Caulerpa* prisutnih u Jadranskom moru testiranjem njihove akutne i kronične toksičnosti te utjecaja na stanični detoksikacijski sustav faze I. Akutna citotoksičnost testirana je MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)) testom, kolorimetrijskom metodom kojom se određivalo preživljavanje ribljih PLHC -1/wt stanica nakon izlaganja ekstraktima. Kronična toksičnost ekstrakata određena je AlgaeTox testom kojim se određuje inhibicija rasta jednostaničnih algi vrste *Scenedesmus subspicatus*. Za određivanje indukcije staničnog detoksikacijskog sustava faze I korišten je EROD (etoksirezorufin – O – deetilaza) test, pomoću kojeg se mjeri indukcija aktivnosti CYP1A1 detoksikacijskog enzima. Rezultati dobiveni opisanim biotestovima su pokazali jasan toksični učinak na stanice u prisutstvu ekstrakata obje testiranih vrsta algi roda *Caulerpa*.

**(34 stranice, 12 slika, 4 tablice, 50 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)**

**Ključne riječi: inhibicija rasta algi, indukcija CYP1A1 monooksigenaza, sekundarni metaboliti, EROD biotest, MTT biotest, AlgaTox biotest**

**Voditelj: dr. sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik, IRB**

**Suvoditelj: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv.prof.**

**Ocjenjitelji: prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, prof. dr. sc. Goran Klobučar, izv. prof. dr. sc. Danijel Orešić**

**Rad prihvaćen: 4.7.2019.**

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

## **TOXICITY OF EXTRACTS DERIVED FROM INVASIVE TROPICAL ALGAE FROM THE GENUS *Caulerpa***

Josip Kerkez

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb Hrvatska

The spread of invasive marine algae from the genus *Caulerpa* has a harmful effect on a large number of autochthonous species and causes a drastic reduction of biodiversity, especially by repressing benthic seagrass communities. Aside from its basic physiology characteristics and reproduction strategies, the genus *Caulerpa* enhances its invasive potential by producing toxic secondary metabolites. The main example of these compounds is caulerpenyne, a terpenoid sesquiterpene present in significant amounts in both of the sampled invasive species found in the Adriatic and Mediterranean Sea. Analysing the toxicity of extracts prepared from these invasive algal species through multiple toxicity assays it is possible to test their potential harmfulness to other marine species.

The major goal of this study was to determine (eco)toxic effects of extracts derived from *Caulerpa* species present in Adriatic by testing their acute and chronic toxicity potential and effect on the phase I cellular detoxification system. Acute toxicity was determined by the colorimetric MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) assay used to determine viability of fish PLHC-1/wt cells upon exposure to algal extracts. Chronic toxicity was analysed by the AlgaeTox assay to determine the growth inhibition of the unicellular algae *Scenedesmus subspicatus*. Effects of the algal extracts on the phase I of cellular detoxification was determined by the EROD (ethoxyresorufine-O-deethylase) assay used to measure induction of the CYP1A1 detoxification enzyme. The results from all of the toxicity assays clearly revealed toxicity of algal extracts derived from both *Caulerpa* species.

**(34 pages, 12 figures, 4 tables, 50 references, original in: Croatian)**

**Key words:** algal growth inhibition, CYP1A1 monooxygenase induction, secondary metabolites, cytotoxicity, EROD assay, MTT assay, AlgaeTox assay

**Supervisor:** Dr. Tvrtko Smital, Senior Scientist

**Cosupervisor:** Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc.Prof.

**Reviews:** Dr. Blanka Cvetko Tešović, Prof. Dr. Goran Klobučar, Prof. Dr. Danijel Orešić, Assoc.Prof.

**Thesis accepted:** 4.7.2019.

## POPIS KRATICA:

**7 – ER** – 7-etoksirezorufin

**2P** – 2- propanol

**Ahr** – Arilhidrokarbonski receptor (eng. *Aril Hydrocarbon Receptor*)

**CYC-A** – ciklosporin A

**CYN** – kaulerpenin

**CYP** – citokrom P450 ovisne monooksigenaze

**DCM** – diklormetan

**DMEM – F12** –stanični medij za uzgoj stanica (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Media, Nutrient Mixture F – 12*)

**DMSO** – dimetil sulfoksid

**EROD** – etoksirezorufin – O – deetilaza

**FBS** – fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum*)

**GM** – hranjivi medij (eng. *Growth Media*)

**HEX** – heksan

**Hsp90** – protein toplinskog stresa Hsp90 (eng. *Heat Shock Protein*)

**LC50** – letalna koncentracija 50 (eng. *Lethal Concentration 50*, koncentracija testne tvari koja uzrokuje smrtnost za 50% životinjskih organizama ili stanica)

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

**PBS** – fosfatni pufer za ispiranje stanica (eng. *Phosphaste Buffer Saline*)

**PLHC – 1/wt** – *Poeciliopsis lucida* hepatoma riblja stanična linija (eng. *topminnow*)

**TCDD** – 2,3,7,8 – tetradiklorodibenzodioksin

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Sekundarni metaboliti .....	1
1.2. Alge roda <i>Caulerpa</i> .....	2
1.3. <i>C. taxifolia</i> i <i>C. racemosa</i> u Jadranskom moru .....	3
1.4. Sekundarni metaboliti algi roda <i>Caulerpa</i> .....	4
1.5. Biotestovi .....	5
1.5.1. Testovi toksičnosti .....	5
1.6. Test inhibicije rasta <i>S. subspicatus</i> (AlgaeTox test) .....	8
1.7. Cilj istraživanja .....	10
2. MATERIJALI I METODE.....	11
2.1. Uzorkovanje biološkog materijala .....	11
2.2. Ekstrakcija biološkog materijala .....	11
2.3. Korištene kemikalije i laboratorijska oprema .....	12
2.3.1. Korištene kemikalije .....	12
2.3.2. Laboratorijska oprema .....	12
2.4. EROD test .....	12
2.4.1. Tijek biotesta .....	13
2.4.2. Analiza podataka .....	16
2.5. MTT test .....	16
2.5.1. PLHC – 1/wt stanična kultura .....	16
2.5.2. Tijek biotesta - eksperimentalna procedura .....	16
2.5.3. Analiza podataka .....	19
2.6. AlgaeTox test .....	20
2.6.1. Uzgoj i kultivacija <i>Scenedesmus subspicatus</i> kulture .....	20
2.6.2. Tijek biotesta .....	20
2.6.3. Analiza podataka .....	22
3. REZULTATI.....	24
3.1. Indukcija CYP1A1 enzima.....	24
3.2. Akutni toksični potencijal .....	26
3.3. Kronični toksični potencijal.....	27
4. RASPRAVA.....	29

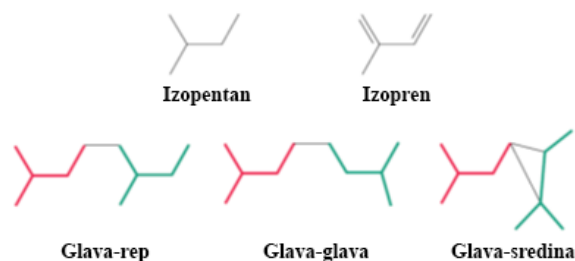
5. ZAKLJUČAK.....	31
6. LITERATURA.....	32



## 1. UVOD

### 1.1. Sekundarni metaboliti

Sekundarni ili specijalizirani metaboliti su različiti spojevi biljaka koji su tijekom biološke i kemijske evolucije nastali zbog nemogućnosti kretanja biljaka. Imaju esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Namdeo, 2007). Zbog toga se umjesto naziva sekundarni sve češće upotrebljava naziv specijalizirani biljni metaboliti kako bi se istaknula njihova specifična i esencijalna uloga (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Zaštita protiv biljojeda, mikrobnih infekcija, privlačenje oprašivača i rasprostranjivača sjemenki, alelopatski spojevi itd., su funkcije u raznim životnim ciklusima biljaka za koje su odgovorni sekundarni metaboliti. Za razliku od njih primarni su oni metaboliti bez kojih biljka ne bi mogla opstati, a omogućavaju joj rast i razvoj. Također, primarni metaboliti se nalaze u svim biljkama, dok se specijalizirani nalaze samo kod određenih biljnih vrsta ili kultivara te su ponekad prisutni u manjim količinama. Do danas je otkriveno preko 200 000 različitih specijaliziranih metabolita, no taj se broj svakim danom povećava zbog sve suvremenijih metoda za detekciju (Ribera i Zuniga, 2012). U pogledu kemijske strukture i svojstava mogu biti vrlo različiti spojevi, terpeni, fenolni spojevi ili alkaloidi. Primjerice, terpeni su jedna od skupina sekundarnih metabolita čija kemijska struktura ima organski spoj izopentan kao osnovu (**Slika 1**). Drugi naziv za izopentan je izopren, po nazivu plina koji nastaje termičkom razgradnjom mnogih terpena. Izopentan je osnovna građevna jedinica za kemijske formule terpena poput monoterpena (10 C atoma) i seskviterpena (15 C atoma) koji čine razne biljne spojeve, sintetizirane kao antibiotike ili spojeve za odbijanje biljojeda.

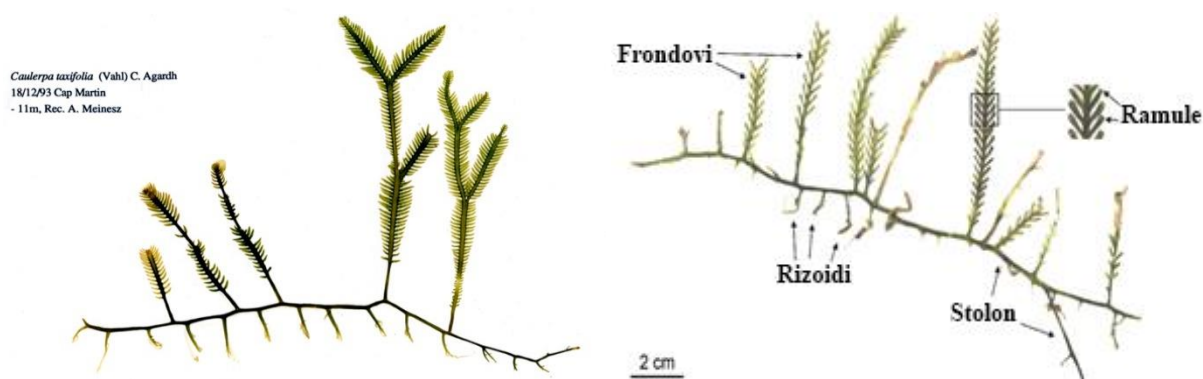


**Slika 1.** Izopentanski kostur, izopreni plin i različite strukture spajanja izopentanskog kostura koje daju različite kemijske strukture izoprenih jedinica (Buchanan, 2000).

Spojevi s alelopatskim učincima za sprječavanje širenja konkurentnih biljnih vrsta su ekološki izrazito zanimljivi, jer omogućavaju neometano rasprostiranje određenih vrsta bez natjecanja za mjesto u ekološkoj niši. Alohtone vrste poput algi *Caulerpa*, uvedene u nove ekosustave pomoću njih se mogu proširiti veoma daleko u kratkom roku, pogotovo u odsustvu prirodnih predatora. Smanjena produktivnost mediteranskih vrsta algi, poput *Cystoseira barbata f. aurantia* i *Gracilaria bursa – pastoris* je pokazana zavisno o produkciji i koncentraciji sekundarnih metabolita vrste *Caulerpa* (Ferrer i sur, 1997).

## 1.2. Alge roda *Caulerpa*

Alge roda *Caulerpa* su vrste zelenih algi koje se mogu razmnožavati spolno i vegetativno, fragmentima talusa koji se veoma lako mogu odvojiti i formirati nove kolonije. Brzina njihovog vegetativnog razmnožavanja, pogotovo kod invazivnih kolonija, razlog je zbog kojeg ove vrste mogu prevladati i zamijeniti autohtone zelene alge sporijeg rasta (West i West, 2007). Tu sposobnost im omogućava njihova morfološka struktura, koju karakteriziraju stanični dijelovi kao što su rizoidi, stolon, talus i kauloidi, spojeni u jednu višejezgrenu stanicu s pseudoorganima (**Slika 2**). Stolon je pri tome morfološka osnova iz koje rastu talusi na kojima se granaju rizoidi. Takva morfološka struktura može narasti do 15 cm u visinu i imati stolone do 150 cm dužine po jedinci. Pojedinačni rizoidi su dugi oko 1 cm, a same vrste je morfološki teško razlikovati, jer se prilagođavaju razlikama staništa i sezonskim utjecajima, poput dubine ili godišnjeg doba (Meinesz, 1995).



**Slika 2.** Talusi morskih algi vrsta *Caulerpa taxifolia* (lijevo) i *Caulerpa racemosa* (desno), (<https://plants.ifas.ufl.edu/plant-directory/caulerpa-taxifolia/>, Klein, Verlaque 2008).

Alge roda *Caulerpa* izvorno nastanjuju tropska mora, a zbog svog atraktivnog izgleda često se koriste kao dekorativne biljke u akvarijima. Nažalost, 1984. god. slučajnim ispuštanjem iz akvarija u Monaku u Mediteran, vrsta *Caulerpa taxifolia* (M. Vahl) C. Agardh, postaje invazivna alga s iznimno brzim potencijalnom širenja u području Mediterana (Meinesz i sur, 2001). Nakon prvog uočavanja u Monaku, sljedeće uočavanje se dogodilo šest godina kasnije, šest km istočno od Monaka (u Francuskoj), da bi se do 2000. zabilježilo 76 uspostavljenih kolonija na obalnom području obiju država, na površini od 3184 ha, bez ubrajanja ostalih „zaraženih“ država (Meinesz i sur, 2001). Njihova dubina kolonizacije može iznositi do 50 m, a površina koju nastanjuju više ovisi o obali gdje se nalaze nego o broju kolonija (manji broj kolonija može pokrivati veću površinu ovisno o tipu obale; Meinesz, 2001). Ubrzo nakon širenja vrste *C. taxifolia*, druga invazivna vrsta istog roda, *C. racemosa* (Forsskål) J. Agardh, koja je vrlo vjerojatno unesena u Mediteran na sidrima brodova koji su plovili tropskim morima, postaje dodatni problem i danas je jedna od najinvazivnijih algi s kojima se suočavamo u području Mediterana. Obje invazivne vrste proširile su se i u Jadranskom moru.

Pored građe i načina razmnožavanja, brzina širenja ovakvih invazivnih vrsta dominantno ovisi o prisustvu, odnosno odsustvu konzumenata i njihovoj bioraznolikosti i morskim strujama, te intenzitetu antropogenih aktivnosti i geografiji područja (Lyons i sur, 2009). Osim ovih čimbenika, svoju sposobnost širenja vrste roda *Caulerpa* vrlo vjerojatno postižu i suzbijanjem ostalih morskih vrsta čije okolišne niše naseljavaju.

### 1.3. *C. taxifolia* i *C. racemosa* u Jadranskom moru

Jadransko more se proteže u smjeru SZ – JI s velikim razlikama između istočne i zapadne obale. Istočnu obalu karakterizira strma i stjenovita obala s većinski vapnenačkom podlogom (90 % svih stijena su vapnenci, dolomiti, karbonati i breča) koja se formirala u miocenu–ranom pliocenu, prije otprilike 3,6–4 milijuna godina. Geomorfološki procesi na takvoj litološkoj podlozi su rezultirali stvaranjem mnogobrojnih otoka i otočja koji čine obalu drugom najrazvedenijom u Europi (Pikelj i Juračić, 2013). Invazivne alge roda *Caulerpa* proširile su se u sjevernom i srednjem Jadranu, a za potrebe ovog istraživanja uzorkovane su na području Vrsara i Starog Grada na otoku Hvaru. Trgovački brodovi koji uplovljavaju u Jadransko more iz ostalih dijelova Mediterana zajedno sa svojim teretom donose i alohtone vrste, na svojim sidrima, koritima ili u balastnim vodama, koje se izbacivanjem u Jadransko more prilagođavaju novom okruženju. Tim putem se mogu prenijeti sve vrste od zooplanktona do beskralježnjaka i riba (David i sur, 2007). Na taj način je najvjerojatnije na Jadransku obalu stigla *Caulerpa taxifolia* 1994., kada je prvi put uočena u pristaništu brodova u Starom Gradu na Hvaru. *Caulerpa racemosa* se istim putem raširila po Mediteranu preko Sueskog kanala, također u slično vrijeme i približno jednakom brzinom (Piazzi i sur, 2005).

Vrsar se nalazi na Istarskom poluotoku, području sjevernog Jadranskog mora (**Slika 3**), u najplićem dijelu Jadranskog mora koji se od Venecijskog zaljeva postepeno produbljuje do 100 m dubine, nakon čega dolazi nagli porast dubine u području srednjeg Jadrana. Zbog takve topografije, sjeverni Jadran sadrži plitkomorske karakteristike s miješanjem morskih i slatkovodnih voda iz rijeke Po (trećina hidrološkog priljeva Jadranskog mora; Orlić i sur, 1992).

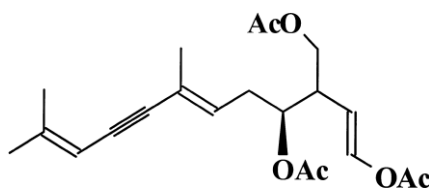
Stari Grad se nalazi na području srednjeg Jadrana (**Slika 3**), u akvatoriju prosječne dubine 120 m, koji je uz to karakteriziran s dvije depresije dubine 260 m i širokom depresijom dubine 1200 m na najjužnijem predjelu. Odlikuju ga izražene karakteristike otvorenog mora, poput stratifikacije slojeva abiotičkih čimbenika (npr. temperatura ili salinitet) i razlike u gustoći slojeva voda. S obzirom na položaj mora ove osobine nisu karakteristične za tranzicijski zaljev (Artegiani i sur, 1996).



**Slika 3.** Lokacije uzorkovanja vrsta roda *Caulerpa* istaknute na istočnoj obali Jadranskog mora (Žuljević i sur, 2009)

#### 1.4. Sekundarni metaboliti algi roda *Caulerpa*

Neki od spojeva izoliranih iz algi roda *Caulerpa* su bili istraživani u kemotaksonomske svrhe, uključujući kaulerpin, kaulerpicin, palmitičku kiselinu,  $\beta$ -sitosterol, fleksilin i trifarin (Vidal i sur, 1984). Međutim, glavni sekundarni metabolit koji proizvode je kaulerpenin (CYN), koji ima antineoplastička i antibakterijska svojstva (Barbier i sur, 2001). Naime, ove alge odbijaju druge biljne i životinjske vrste proizvodnjom toksičnih sekundarnih metabolita (Ferrer i sur, 1997; Meyer i Paul, 1992; Vidal i sur, 1984). Primjerice, kaulerpenin (**Slika 4**) je acetilenski seskviterpen koji je prisutan u značajnim količinama kod obje invazivne vrste roda *Caulerpa* koje nalazimo u Mediteranu, pa tako i Jadranskom moru (Raniello i sur, 2007). Dokazano je da u kontaktu s jajašcima morskih ježinaca kaulerpenin sprječava prvo brazdanje i daljnji rast, te inhibira rast u osam različitih linija ljudskih tumorskih stanica, a utječe i na fosforilaciju proteina (Barbier i sur, 2001).



**Slika 4.** Molekularna struktura kaulerpenina (Barbier i sur, 2001)

Upoznavanje fiziologije i metabolita roda *Caulerpa* može pomoći u kontroliranju njihovog invazivnog širenja i smanjiti oslanjanje na mehaničke metode uklanjanja i/ili kontrole širenja ovih algi, koje su skupe i zahtijevaju složena sredstva poput usisnih pumpi te velik broj osoblja potrebnog za rad s pumpama ili prekrivanje izoliranih kolonija tamnim ceradama koje ne propuštaju svjetlost (Iveša i sur, 2006).

## 1.5. Biotestovi

Istraživanje učinka pojedinih tvari na žive organizme u okolišu već se dulji niz godina ispituje pomoću biotestova. Njihovo izvođenje podrazumijeva izlaganje testnog organizma, izoliranog organa ili stanice u kulturi određenoj tvari, odnosno fizičkom ili kemijskom čimbeniku ili kombinaciji više njih, te promatranje nastalog učinka. Kao krajnji cilj ističe se otkrivanje djelovanja testne tvari na promatrani organizam, odnosno koju staničnu strukturu, tkivo ili organ najviše pogađa, te nakraju tu promjenu kvalitativno i kvantitativno prikazati. Da bi nastala promjena bila dokazana kao posljedica djelovanja toksikanta, tijekom izvođenja testa potrebno je imati kontrolnu skupinu organizama. Ta skupina održava se u istim uvjetima kao i testni organizmi, ali nije izložena djelovanju toksikanata i naziva se negativna kontrola. Obzirom da još nije razvijen test koji bi u potpunosti pružao informaciju o toksičnom djelovanju nekog toksikanta na ekosistem, procjena toksičnosti provodi se na temelju rezultata više testova. Biotestovi se mogu izvoditi na različitim organizmima kao npr. vodenim beskrležnjacima, oplođenim jajima ptica, vodozemcima, algama, vodenim makrofitima i ribama. Pri tom je izbor testnog organizma odnosno razvojni stadij životnog ciklusa izuzetno važan faktor osjetljivosti. Kao pokazatelj toksikološkog učinka u biotestu koriste se smrt ili oboljenje životinje te rane promjene na biokemijskoj razini što je posljedica novih znanja o samom tijeku toksičnih procesa i njihovom učinku na organizam. Alge su također često korišteni testni organizmi obzirom da one čine početak prehrambenog lanca, pa je nužno pretpostaviti kakav će učinak imati neka istraživana tvar ukoliko putem prehrambenog lanca dođe do konzumenata višeg reda (Lyubenova i Boteva, 2016).

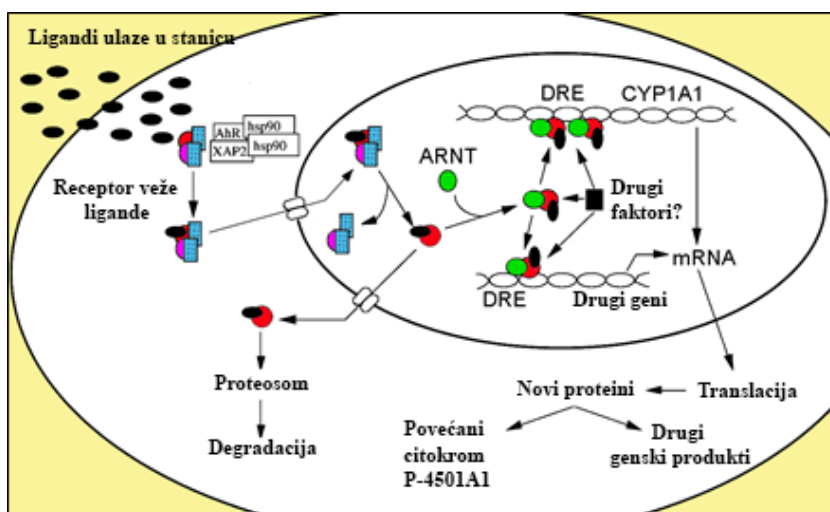
### 1.5.1. Testovi toksičnosti

U ovom sam radu koristio tri različita testa toksičnosti na dva testna organizma – riblje stanice i alge. Za određivanje indukcije staničnog detoksikacijskog sustava faze I korišten je EROD test pomoću kojeg se mjeri indukcija aktivnosti CYP1A1 detoksikacijskog enzima. Akutna citotoksičnost testirana je MTT testom kojim se određivalo preživljavanje ribljih PLHC -1/wt stanica nakon izlaganja ekstraktima vrsta roda *Caulerpa*. Kronična toksičnost ekstrakata određena je AlgaeTox testom kojim se određuje inhibicija rasta jednostaničnih algi vrste *Scenedesmus subspicatus*.

#### Indukcija CYP1A1 enzima (EROD test)

Organski ksenobiotici koji uđu u stanice se moraju eliminirati prije nego što završe u staničnom metabolizmu i naprave štetu organizmu ispoljavajući potencijalni toksični učinak. Reakcijama monooksigenacije ksenobiotika posredstvom detoksikacijskih enzima dodaje se kisik na nereaktivne spojeve koji se zatim mogu izbaciti iz sustava. Taj proces zajedno s redukcijom i hidroksilacijom pripada reakcijama faze I. i pretvara toksikante u produkte koji su podložni

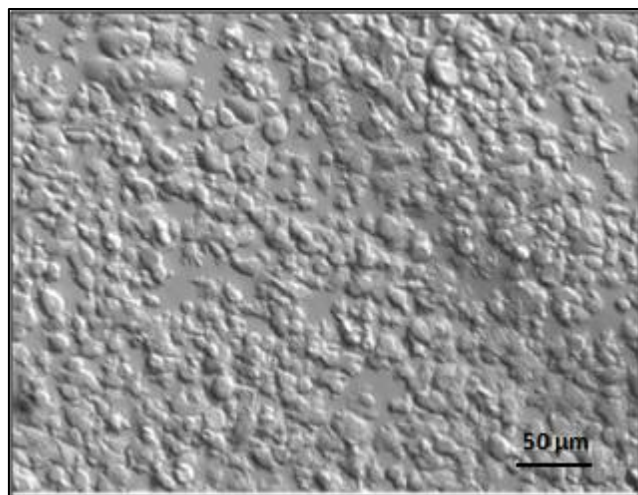
biotransformacijama putem enzima faze II., ako se kao metaboliti faze I. ne mogu efikasno ukloniti iz stanice. Enzimi faze II. eliminaciju većine metabolita faze I. postižu dodatnom konjugacijom metabolita, pomoću staničnih produkata poput aminokiselina, glutationa, sulfata ili ugljikovodičnih derivata koji smanjuju lipofilnost i povećavaju polarnost metabolita, te se u konačnici mogu izbaciti iz stanice prije nego što ispolje potencijalni štetni/toksični učinak. Detoksikacijski enzimi faze I. za katalizu koriste sustav hemoproteina citokrom – P450 (CYP), polipeptid koji ima apsorpcijski spektar pri valnoj duljini od 450 nm. Prvi puta otkriveni 1985. god., CYP ovisni enzimi pronađeni su u mikrosomima jetre kod skoro svih kralježnjaka i kod velikog broja beskralježnjaka. Njihova indukcija je značajno povećana kada stanica dođe u kontakt s različitim organskim ksenobiotičima. Citoplazma stanica sadrži AhR receptor (eng. *aryl hydrocarbon receptor*) vezan za hsp90 *chaperon* protein. Kada se na receptor veže ksenobiotik on se otpušta s hsp90 i veže za ARNT element (Ah receptorski nuklearni translokator) te odlazi u staničnu jezgru gdje se veže za područje DNA koje sadrži gene odgovorne za enzime koji metaboliziraju ksenobiotike (**Slika 5**). Tako se primjerice inducira transkripcija CYP1A1 enzima koja se može količinski izmjeriti spektrofotometrijskim ili fluorimetrijskim metodama (Collins, 1985; Feyereisen, 1984; Klotz i sur, 1984).



**Slika 5.** Grafički prikaz mehanizma induciranja transkripcije CYP1A1 enzima.

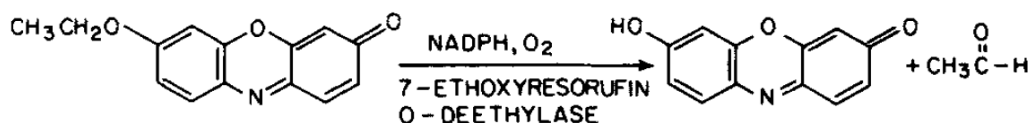
(<https://www.researchgate.net/profile/Samuel-Mucio-Ramirez2>)

Stanična linija hepatoma riblje vrste *Poeciliopsis lucida* (**Slika 6**) uzgaja se u odgovarajućem hranjivom mediju, a indukcija CYP1A1 ovisnih monooksigenaza kao dominantnih enzima faze I. određuje se izlaganjem stanica supstratu etoksirezorufin – O – deetilazi (EROD). Reakcija dealkilacije koja se pri tome odvija stvara fluorescentni produkt rezorufin (**Slika 7**), a intenzitet fluorescencije posljedično je proporcionalan aktivnosti, odnosno indukciji CYP1A1 detoksikacijskog enzima. Riblja stanična linija *Poeciliopsis lucida* hepatoma (PLHC – 1/wt) je jedna od mnogih vrsta ribljih staničnih linija koje se koriste u ekotoksikološkim istraživanjima. PLHC stanice imaju sposobnost metaboliziranja ksenobiotika, sadrže AhR receptor i imaju kapacitet induciranja citokroma P450A1 (Brüschweiler i sur, 1995).



**Slika 6.** Hepatoma stanična linija riblje vrste *Pociliopsis lucida* (Zaja i sur, 2008).

Mjerenjem aktivnosti etoksirezorufin – O – deetilaze (EROD test) možemo odrediti aktivnost CYP1A1 enzima, odnosno odgovor stanice na povećanu izloženost lipofilnim ksenobiotičima, primjerice policikličkim aromatskim ugljikovodicima kao tipičnim i vrlo važnim okolišnim zagađivačima (Hahn i sur, 1996). Stoga primjenom EROD testa *in vitro* možemo ispitati učinak ekstrakata dobivenih iz uzoraka algi roda *Caulerpa* na aktivnost temeljnog staničnog detoksikacijskog sustava faze I.



**Slika 7.** Biotransformacija 7 – etoksirezorufina posredstvom CYP450 monooksigenaza (7-etoksirezorufin O - deetilaze) u fluorescentni produkt 7 – etoksirezorufin (7 – ER, Klotz i sur, 1984).

### Akutni toksični potencijal (MTT test)

Citotoksičnost, tj. smrt stanica uzrokovana toksikantima se može izmjeriti na više načina, koji imaju različite razine efikasnosti i različite razine primjene kao biomarkeri u ispitivanjima toksičnosti. Pri tome uzrok stanične smrti mogu biti različiti događaji kao što su pikoniza (promjena raspodjele kromatina unutar jezgre i deformacija njezinog oblika), karioliza (raspadanje stanične jezgre), apoptoza (programirana stanična smrt uzrokovana kondenzacijom kromatina i citoplazme u apoptozna tjelešca) te nekroza (stanična smrt, uzrokovana bolešću ili ozljedom stanice) koja ima vlastite potpodjele: koagulacijska nekroza (prekomjerno zgrušavanje citoplazmatskih proteina), likvifikacijska nekroza (razgradnja stanica zbog oslobađanja staničnih enzima), „sirasta“ nekroza (eng. *caseous*, nekroza u kojoj se stanice razgrađuju u veliku masu proteina i masti) i gangrenozna nekroza (kombinacija likvifikacijske i koagulacijske nekroze). Svi navedeni oblici i tipovi stanične smrti su samo simptomi stanica na stres koji mogu uzrokovati toksikanti, ali i drugi uzroci poput ozljeda ili infekcija (Newman, 2015).



Mjerenjem aktivnosti enzima stanica kralježnjaka, te testiranjem kronične i akutne toksičnosti je ispitana toksičnost ekstrakata algi roda *Caulerpa*. Taj jednostavan kolorimetrijski test pomoću enzima vijabilnih stanica monotetrazolijsku sol (MTT) biotransformira u formazan, kojim kvantitativno možemo izmjeriti udio preživjelih stanica prethodno izloženih različitim koncentracijama ekstrakta algi roda *Caulerpa* (Ferrari i sur, 1990).

Test se temelji na određivanju inhibicije rasta PLHC – 1/wt stanica nakon 96 h izlaganja testnom uzorku u usporedbi sa stanicama koje nisu izlagane testnom uzorku (kontrola), odnosno stanicama koje su izlagane modelnoj toksičnoj tvari (pozitivna kontrola). Učinak testnih uzoraka možemo odrediti tek dodavanjem indikatora MTT koja ispitivane uzorke boji različitim nijansama ljubičaste boje. Odgovor uzoraka mjeri se fotometrijski na odgovarajućoj valnoj duljini, a iz izmjerenog odgovora određuje se razina preživljavanja (vijabilnost) stanica u odnosu na kontrolne uzorke.

Riblje PLHC – 1/wt stanice koje su bile već uzgajane u kulturi za izvođenje EROD testa koristile su se i u ovome testu, što je pojednostavilo istovremeno izvođenje svih testova i proširilo opseg rezultata u isto vrijeme.

### Kronični toksični potencijal (AlgaeTox test)

Stanice koje su izložene toksikantima za vrijeme od 10 % svojeg životnog vijeka ili dulje (optimalno bar dva generacijska vremena), te kao posljedicu ispolje štetne učinke pokazuju kroničnu toksičnost (Newman, 2015). Pri tome razina štetnog učinka može varirati od promjene metabolizma do stanične smrti. AlgaTox test je relativno jednostavna i jeftina metoda, unatoč tome što se temelji na određivanju kronične toksičnosti pomoću velikog broja jedinki kroz nekoliko generacija. Ovisno o korištenim algama i testnom protokolu osjetljivost testa može značajno varirati. Međutim, razlike u osjetljivosti također mogu biti uzrok lošeg kontroliranja temeljnih fizičko-kemijskih parametara, koji pri najmanjim promjenama mijenjaju stope rasta kultura algi. No, kao testni model kultura algi je brzorastući i dinamični sustav koji u kontroliranim uvjetima s malom testnom biomasom i kratkim vremenom izlaganja može dati pouzdane rezultate (Nyholm i Kållqvist, 1989).



Slika 8. Vrsta *Scenedesmus*, (<http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subsp>)



Prema tome, ispitivanje kronične toksičnosti algi roda *Caulerpa* i prethodno spomenutih sekundarnih metabolita na autohtone vrste Jadranskog mora istražuje se pomoću jednostaničnih zelenih algi koje koristimo kao pokusne organizme. Pri tome kultura algi, koja se uzgaja kroz par generacija, nakon nekog vremena dosegne fazu eksponencijalnog rasta, nakon čega se mjeri inhibicija rasta uzrokovana spojem ili uzorkom koji želimo testirati. Kako su stanice previše brojne da bi se izravnim prebrojavanjem svih stanica odredila promjena rasta, umjesto brojanja stanica mjeri se ukupna fluorescencija klorofila *a* na početku i kraju pokusa, koja je u izravnoj korelaciji s brojem stanica. Vrsta alge korištena za pokus je jednostanična alga *Scenedesmus subspicatus* (**Slika 8**).

## **1.7. Cilj istraživanja**

Temeljni cilj ovog istraživanja bio je odrediti toksični potencijal invazivnih morskih algi roda *Caulerpa*.

Istraženi su uzorci dobiveni ekstrakcijom dviju vrsta roda *Caulerpa* prisutnih u Jadranu: *Caulerpa taxifolia* i *Caulerpa racemosa*, a njihov toksični učinak na riblje stanice i alge *S. subspicatus* procijenjen je korištenjem tri različita biotesta.

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Uzorkovanje biološkog materijala**

Uzroci alge vrste *Caulerpa taxifolia* su uzeti na području Starog Grada, na otoku Hvaru, u rujnu 2013. god. na dubinama od 5 – 10 m u velikoj uvali na sjevernom dijelu otoka. Uzorci alge vrste *C. racemosa* su prikupljeni u prosincu 2012. god. na najsjevernijoj točki rasprostranjenosti te vrste na području grada Vrsara, također na dubinama od 5 – 10 m. Uzorci *C. racemosa* su uzeti zajedno sa sedimentom, dok su uzorci *C. taxifolia* prethodno isprani i očišćeni od sedimenta prije zamrzavanja i daljnjeg pripremanja.

### **2.2. Ekstrakcija biološkog materijala**

Izvagano je zasebno 20 g smrznutih uzoraka za *C. taxifolia* i *C. racemosa* od kojih je za svaku pojedinačno izdvojeno po 10 g za ekstrakciju u diklormetan/2 – propanolu (DCM – 2p), a druga polovica je izdvojena za ekstrakciju u heksan – diklormetanu (HEX – DCM). Iz uzoraka je zatim papirnatim ručnicima istisnuta voda te je u četiri falcon tubice od 50 mL raspoređeno po 5 g uzoraka. Dvije falcon tubice su iskorištene za ekstrakciju diklormetan/2 – propanolom u omjeru otapala 1:1, dok su druge dvije falcon tubice pripremljene za ekstrakciju heksan – diklormetanom u omjeru otapala 2:1.

Nakon što su otapala napravljena u tim omjerima 30 mL otapala je uliveno u svaku tubicu. Uzorci su zatim homogenizirani Polytron homogenizatorom jednu minutu pri brzini 0,5 na postavkama uređaja. Nakon toga su heksanski uzorci još jednom homogenizirani u trajanju od jedne minute pri istoj brzini. Uzorci su zatim ručno promućkani, stavljeni u ledu te vorteksirani 5 minuta na maksimalnoj brzini. Sljedeći korak je bilo centrifugiranje svih uzoraka dva puta, prvo 5 minuta na 2300 x *g*, a zatim 5 min na 2500 x *g*. Nakon prvog centrifugiranja pipetom je ručno uklonjen vodeno/lipofilni sloj koji se stvorio na površini.

Potom je 5 mL uzoraka dekantirano u falcon tubice od 15 mL i centrifugirano 5 minuta pri 2300 x *g*. Uzorci su zatim prebačeni u staklene epruvete od 10 mL koje su pripremljene za uparavanje uzoraka do suhog ekstrakta na Turbo Vap uparivaču, u struji N<sub>2</sub> na 45°C tijekom 120 min. Ostaci uparavanja su zatim udruženi u jednu staklenu epruvetu gdje su uparavani do volumena 1 mL nakon čega su uzorci bili prebačeni u staklene bočice i upareni do suhog ostatka. Nakon vaganja suhi ostatak je otopljen u organskom otapalu, dimetil sulfoksidu (DMSO) te su konačne koncentracije iznosile 8,5 mg/mL za *C. racemosa*, odnosno 30 mg/mL za *C. taxifolia*.

## **2.3. Kemikalije i laboratorijska oprema korištene u testovima**

### **2.3.1. Korištene kemikalije**

- Stanični medij za uzgoj stanica, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F – 12 (DMEM F-12 Ham)
- Fosfatni pufer za ispiranje stanica, Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS)
- Serum goveđeg fetusa, Fetal Bovine serum (FBS)
- 0,025% Trypsin u PBS-u (Trypsin)
- 2,3,7,8 - Tetradiklorodibenzodioxin (TCDD)
- 7 - Etoksirezorufin (7 – ER)
- Fluorescamin
- Acetonitril
- Ciklosporin A (CYC)
- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), MTT
- Izopropanol (2 – propanol)
- Kalijev bikromat ( $K_2Cr_2O_7$ )
- GM medij za rast algi (**Tablica 3**)
  - o Otopina 1
  - o Otopina 2
  - o Otopina 3
  - o Otopina 4
  - o Destilirana voda ( $H_2O$ )

### **2.3.2. Laboratorijska oprema**

- $CO_2$  inkubator za staničnu kulturu na 37 °C – Heraeus Instruments, Njemačka;
- kabinet za rad u sterilnim uvjetima – Heraeus Instruments, Njemačka;
- autoklav za sterilizaciju plastičnih nastavaka i otopina;
- suhi sterilizator za sterilizaciju staklenog posuđa;
- sušionik;
- magnetna miješalica;
- vodena kupelj na 37 °C;
- Sterilni nastavci, pipete, stakleno posuđe
- Plastične epruvete i plastično posuđe
- Jednokanalne i 8-kanalne mikropipete – Eppendorf, Njemačka;
- Inverzni mikroskop – Hund, Njemačka;
- sterilne plastične bočice za uzgoj stanica, površine 75 cm<sup>2</sup> – Nunc, Danska;
- plastične mikroploče, s 96 jamica ravnog dna – TPP, Trasadingen, Švicarska;
- Hemocitometar
- Spektrofotometrijski čitač za mikroploče – Tecan, Austrija

## **2.4. EROD test**

Stanice su bile uzgajane u  $CO_2$  inkubatoru za staničnu kulturu na 37 °C. Na dnu inkubatora nalazi se sterilna destilirana voda koja je zaslužna za stvaranje atmosfere visoke vlažnosti zajedno sa smjesom zraka i 5%  $CO_2$ , čime se osiguravaju idealni uvjeti za rast i razvoj stanica. Stanice su uzgajane u 5% otopini seruma FBS i medija DMEM F-12 Ham (pH 7,4) u sterilnim plastičnim bočicama površine 75 cm<sup>2</sup>, čime su stanicama osigurane sve hranjive komponente (aminokiseline, vitamine, glukoza, soli), hormoni i faktori rasta neophodne za rast i diobu stanica. Stanice su presađivane dva

puta tjedno, ovisno o konfluentnosti podloge (postotak pokrivenosti podloge). Proces presađivanja uključuje stvaranje više linija rasada stanica od početne kulture stanica. Na taj način se uzgajaju stanice i pripremaju za provođenje biotesta.

### **2.4.1. Tijek biotesta**

#### **Priprema stanica**

Presađivanje je vršeno kada su stanice prilijepljene na podlozi plastičnih bočica za uzgoj dosegle konfluentnost (pokrivenost) od 90 – 95 %. Potrošeni medij je bio dekantiran i stanice su se ispirale 1x s 10 mL PBS-a. Nakon toga je dodan 1 ml tripsina/EDTA na 2-3 min da se stanice odvoje s podloge. Reakcija enzima tripsina/EDTA na fibronektin zaustavlja se dodavanjem 2 ml otopine 5 % FBS seruma i DMEM F-12 Ham medija, kako bismo zaustavili daljnju tripsinizaciju i moguće oštećenje stanične membrane. Mješavina stanica i medija je zatim pipetom resuspendirana i razrijeđena 1:5. Sve zajedno je spojeno s već unaprijed pripremljenom otopinom 5 % FBS seruma i DMEM F-12 Ham medija.

#### **Brojanje stanica**

Uzorak stanica je zatim prebačen u plastičnu epicu u razrjeđenju 1 : 5 (omjer 200 µL stanica : 800 µL medija). Tako su stanice lakše izbrojene na hemocitometru pod invertnim mikroskopom, pri čemu je njihova gustoća izračunata po sljedećoj formuli:

$$C = n \times 10^4$$

C.....koncentracija stanica (broj stanica / ml)

n.....srednja vrijednost broja stanica po kvadratu

Volumen stanične suspenzije koju smo razrijedili do konačnog volumena izračunali smo putem izraza:

$$V_s = \frac{C_a \times V}{C}$$

Ca.....broj željenih stanica (50x 10<sup>4</sup> st) / ml

C.....broj izmjerenih stanica / ml

V<sub>s</sub>.....volumen stanične suspenzije (ml)

V.....konačni volumen medija (ml)

#### **Nasađivanje stanica u mikroploče**

Prethodno izračunat volumen stanica zatim je nasađen u sterilnim uvjetima u mikroploču s 96 jamica ravnog dna te su stanice ostavljene na 24 h u 200 µL DMEM F-12 Ham 60 od 96 dostupnih jamica (za test su izostavljene sve rubne jamice). Korištena je otopina DMEM F-12 Ham hranjivog medija i FBS-a koji je činio 5 % otopine. Rubne jamice bez nasađenih stanica su bile ispunjene s 200

$\mu\text{L}$  PBS-a. Stanice su zatim ostavljene u inkubatoru za stanične kulture (5–10 % vlažnosti) na temperaturi od 30°C tijekom 24 h.

#### **Priprema serijskih razrjeđenja uzoraka i pozitivne kontrole**

Nakon inkubacije od 24 h u sterilnom kabinetu su na novoj mikroploči pripremljena razrjeđenja ekstrakata, negativne (DMEM F-12 Ham medij) i pozitivne kontrole 2,3,7,8 – tetradiklorodibenzodioksina (TCDD) po prethodno izračunatim rasponima (**Tablica 1**). Na čistoj mikroploči bez pokusnih stanica pripremljena su dva replikata s rasponom od deset različitih koncentracija za ekstrakte i pozitivnu kontrolu i negativnu kontrolu, koja se sastojala samo od dvije jamice ispunjene DMEM – F12 medijem bez FBS-a. Pozitivna kontrola mjeri učinak prethodno poznate tvari koja mora dati očekivani odgovor na grupi uzoraka koji se kasnije može usporediti sa nepoznatim učinkom ekstrakata. TCDD je dioksin koji pripada polikloriranim dibenzo – p – dioksinima te ima niz štetnih učinaka na ljudske i životinjske sustave. Veže se u stanice pomoću Ahr receptora (Kobayashi i sur, 2015) što je potrebno za mehanizme EROD biotesta.

#### **Nasađivanje uzoraka u mikroploče s uzgojenim stanicama i dodavanjem 7 – etoksirezorufina (7 – ER)**

Različite koncentracije razrjeđenja (**Tablica 1**) su postignute serijskim razrjeđivanjem početnih uzoraka ekstrakata u DMEM F-12 mediju, u prethodno izračunatim volumenima koji će dati željene koncentracije za test. Razrjeđena su od početnih koncentracija uzoraka, koje su iznosile 30 mg/mL za ekstrakt *C. taxifolia* i 8,5 mg/mL za ekstrakt *C. racemosa*. Iz ploče s uzorcima je zatim 8 - kanalnom mikropipetom oprezno izbačeno 100  $\mu\text{L}$  medija iz stanica (da se izbjegne uklanjanje stanica iz ploče) i nanoseno je 100  $\mu\text{L}$  već spomenutog razrjeđenja ekstrakata uzoraka, počevši od najmanje do najveće koncentracije.

Mikroploča je zatim obilježena i ponovno ostavljena u inkubator pri 37 °C na dodatnih 24 h.

#### **Mjerenje aktivnosti CYP1A1 enzima**

Nakon 24 h izlaganja uzorcima serijska razrjeđenja i medij za rast stanica je ispražnjen iz mikroploča i svaka jamica isprana sa 100  $\mu\text{L}$  PBS-a. Izmjerena je aktivnost CYP1A1 enzima pomoću dodavanja razrjeđenog fluorescentnog supstrata 7 – etoksirezorufina u Tecan čitaču za mikroploče. Sedam etoksirezorufin je pri tome bio u fosfatnom puferu (50 mM) pH vrijednosti 8.0 u koncentraciji od 0,325  $\mu\text{L}$  7-ER/mL pufera.

Otopina 7-ER i fosfatnog pufera je dodana u volumenu od 100  $\mu\text{L}$  u svaku jamicu. Mjerenje aktivnosti CYP1A1 enzima je napravljeno spektrofotometrijskim čitačem za mikroploče (Tecan, Infinite 200) pri čemu se pratila promjena pretvaranja 7 – ER u rezorufin na specifičnim valnim duljinama ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}/590 \text{ nm}$ ) pri temperaturi od 30 °C. Kinetičko mjerenje se odvijalo u 11 ciklusa s vremenskim intervalom od 1 minute. Nakon toga je mikroploča s izmjerenim uzorcima pohranjena na -20 °C, a idući dan je mjerena koncentracija proteina.

**Tablica 1.** Razrjeđenja ekstrakata *C. taxifolia* i *C. racemosa* te pozitivne kontrole (TCDD) prikazana u omjeru razrjeđenja i koncentracijama izraženim u µg/mL.

Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. taxifolia</i> )	Volumen medija (µL)
1:100	300	6	277
1:200	150	162	162
1:300	100	204	102
1:500	60	187	124
1:750	40	191	96
1:1000	30	167	56
1:2000	15	102	102
1:5000	6	84	126
1:10000	3	90	90
1:20000	1,5	60	60

Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. racemosa</i> )	Volumen medija (µL)
1:100	85	6	277
1:200	42,5	162	162
1:300	28,3	204	102
1:500	17	187	124
1:750	11,3	191	96
1:1000	8,5	167	56
1:2000	4,25	102	102
1:5000	1,7	84	126
1:10000	0,85	90	90
1:20000	0,43	60	60

Koncentracija (TCDD) (nM)	Volumen TCDD (µL)	Volumen medija (µL)
5	4	366
4	250	63
3	193	64
2	137	67
1	86	86
0,3	53	123
0,1	56	112
0,03	48	112
0,01	40	80
0	-	120

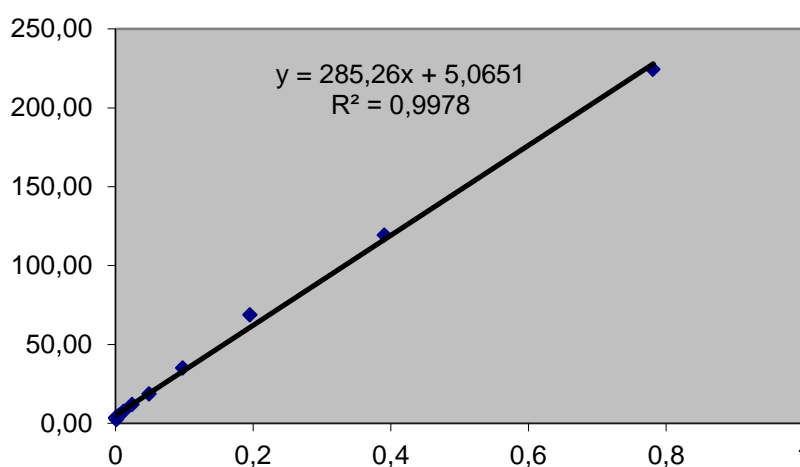
### Mjerenje koncentracije proteina

Za normalizaciju EROD aktivnosti izmjeren je sadržaj proteina. Mikroploče su izvađene s -20 °C i ostavljene na sobnoj temperaturi. U svaku jamicu mikroploče s uzorkom dodano je po 100 µL otopine flourescamina u acetonitrilu u koncentraciji 0,15 mg/mL. Nakon 3-5 minuta inkubacije u inkubatoru mjerenje je provedeno na valnim duljinama ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  =390/465 nm) uz prethodno protresanje stanica na 5 sekundi. Dobiveni podatci su zatim iskorišteni za izračunavanje aktivnosti enzima.

## 2.4.2. Analiza podataka

Dobiveni podaci su obrađeni u „Microsoft Office Excel 2010“ programu, prvo pomoću LINEST (“least square“ metode) linearne funkcije ( $y = ax + b$ ). Podaci su zatim izraženi u vrijednostima po minuti (dF/min) i podijeljeni s „a“ koeficijentom rezorufinske kalibracijske krivulje poznatih vrijednosti, pri čemu je dobivena promjena fluorescencije u pmol po min dF(pmol/min). Mjerenja su zatim stavljena u omjer s dobivenim vrijednostima proteina da bi dobili konačnu vrijednost i aktivnosti CYP1A enzima izraženu u pmol/min/mg proteina po jamici. Podaci obrađeni u Microsoft Excelu su zatim logaritmirani i normalizirani u sigmoidalnu krivulju u programu Graphpad Prism 5.0.

Fluorimetrijskim mjerenjima rezorufina na valnim duljinama od ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 535/590$  nm) je izračunata kalibracijska krivulja rezorufina iz čijeg linearnog dijela je dobivena jednačba za pravac (Slika 9), korištena u kasnijim izračunima produkcije rezorufina.



**Slika 9.** Izmjerena kalibracijska krivulja rezorufina. Apscisa prikazuje količinu rezorufina izraženu u pmol, a ordinata fluorescentne jedinice

## 2.5. MTT test

### 2.5.1. PLHC – 1/wt stanična kultura

Korištene su PLHC-1/wt stanice, stoga je postupak uzgajanja stanične kulture i pripremanja, stanica u mikropločama isti kao i kod EROD testa. Korištena je otopina DMEM – F12 hranjivog medija koja je sadržavala 5 % FBS-a. Rubne jamice bez nasađenih stanica su bile ispunjene s 200  $\mu$ L PBS-a i cijela mikroploča je stavljena u CO<sub>2</sub> inkubator za stanične kulture na temperaturu od 30°C na 24 sata.

### 2.5.2. Tijek biotesta

#### Brojanje stanica

Stanice su pripremljene i izbrojane po istom postupku kao i kod EROD testa u odlomku 2.3.3. s izmjenom formule volumena stanične suspenzije koja mijenja broj željenih stanica, potrebnih za biotest.



Volumen stanične suspenzije koju smo razrijedili do konačnog volumena izračunali smo putem izraza:

$$V_s = \frac{C_a \times V}{C}$$

$C_a$ .....broj željenih stanica ( $20 \times 10^4$  st)/ ml

$C$ .....broj izmjerenih stanica / ml

$V_s$ .....volumen stanične suspenzije (ml)

$V$ .....konačni volumen medija (ml)

### **Priprema serijskih razrjeđenja uzoraka i pozitivne kontrole**

Nakon 24 sata rasta kada su stanice postigle željenu brojnost, u sterilnom kabinetu na posebnoj mikroploči su pripremljena serijska razrjeđenja uzoraka s deset različitih koncentracija u dva replikata, pomoću prethodno izračunate tablice razrjeđenja (**Tablica 2**).

Kao pozitivna kontrola korišten je modelni citotoksični agens ciklosporin A (CYC-A), a za negativnu kontrolu je ponovno samo ostavljeno 200  $\mu$ L medija u dvije jamice. Zatim je iz mikroploče sa stanicama mikropipetom oprezno izvađeno 100  $\mu$ L medija i dodano 100  $\mu$ L pripremljenog razrjeđenja ekstrakata i CYC-A (**Tablica 2**) počevši od najmanje koncentracije do najveće, a izložene stanice su potom ponovno ostavljene u inkubatoru na 72 sata za mjerenje akutne toksičnosti.

**Tablica 2.** Shema razrjeđenja ekstrakta *C. taxifolia*, *C. racemosa* i ciklosporina – A (CYC-A, pozitivna kontrola).

Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. taxifolia</i> )	Volumen medija (µL)
1:100	300	6	277
1:200	150	162	162
1:300	100	204	102
1:500	60	187	124
1:750	40	191	96
1:1000	30	167	56
1:2000	15	102	102
1:5000	6	84	126
1:10000	3	90	90
1:20000	1,5	60	60
Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. racemosa</i> )	Volumen medija (µL)
1:100	85	6	277
1:200	42,5	162	162
1:300	28,3	204	102
1:500	17	187	124
1:750	11,3	191	96
1:1000	8,5	167	56
1:2000	4,25	102	102
1:5000	1,7	84	126
1:10000	0,85	90	90
1:20000	0,43	60	60
Koncentracija (µM)	Volumen CYC-A (µL)	Volumen medija (µL)	
30	2	257	
20	137	69	
10	86	87	
3	53	124	
1	57	116	
0,3	53	123	
0,1	56	113	
0,03	49	115	
0,01	44	88	

### Spektrofotometrijsko mjerenje

72 sata kasnije čitav tekući sadržaj mikroploče je izbačen i stanice su isprane sa 100 µL PBS-a. PBS je zatim izbačen iz mikroploče, te je dodan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid MTT.

Stanice su zatim izložene 100 µL otopini DMEM medija i MTT-a koja je mješavina od 7,2 mL DMEM i 0,8 mL MTT pomiješanog u kadici koji je iskorišten za cijelu mikroploču. Ploča je zatim ostavljena u inkubatoru na 3 sata.

Mikropipetom je izvučen sav tekući sadržaj iz jamica, kako bi se stanice koje su ostale na dnu jamice izložile volumenu od 100 µL izopropanola i protresle na mućkalici 15 minuta na 350 rpm. Tecan čitačem za mikroploče je potom izmjerena apsorbancija na 578 nm valne duljine s referentnim filterom namještenim na 750 nm.

### 2.5.3. Analiza podataka

Izvorni računalni program Tecan čitača za mikroploče korišten je za početnu obradu dobivenih podataka mjerenja, uz automatsko oduzimanje vrijednosti referentnog filtera. Podaci su zatim iz Microsoft Excel programa prebačeni u Graphpad Prism 5.0 računalni program pomoću kojeg su podatci bili logaritmirani i pretvoreni u postotke koji su bili korišteni za grafičku prezentaciju rezultata MTT testa pomoću ne linearno regresivnog modela i sigmoidalne krivulje.

$$y = b + \frac{(a - b)}{(1 + 10^{((\text{Log} LC_{50} - x) * h)})}$$

y.....doza – odgovor krivulja

b.....minimalni zabilježeni odgovor (dno krivulje)

a.....maksimalni zabilježeni odgovor (vrh krivulje)

h.....nagib krivulje

x.....logaritam inhibicijske koncentracije

LC50.....letalna koncentracija 50 (koncentracija testne tvari koja uzrokuje smrtnost za 50% životinjskih organizama ili stanica, dobiveno u rezultatima)

## 2.6. AlgaeTox test

### 2.6.1. Uzgoj i kultivacija *Scenedesmus subspicatus* kulture

Za pokus je korištena prethodno uzgojena kultura slatkovodnih jednostaničnih zelenih algi *S. subspicatus*. Pripremljen je GM medij za rast algi koji se sastojio od 10 mL štok otopine 1 te po 1 mL štok otopina 2,3 i 4 (Tablica 3). Ostatak je nadopunjen destiliranom vodom do 1000 mL i pH otopine je namješten na 8,1 pomoću 1 M otopine HCl/NaOH.

**Tablica 3.** Koncentracije nutrijenata otopina za GM medij.

Otopine	Nutrijenti	Koncentracija u otopini	Završna koncentracija otopine u testu
Otopina 1	NH <sub>4</sub> Cl MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g/L 1.2 g/L 1.8 g/L 1.5 g/L 0.16 g/L	15 mg/L 12 mg/L 18 mg/L 15 mg/L 1.6 mg/L
Otopina 2	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	64 mg/L 100 mg/L	64 µg/L 100 µg/L
Otopina 3	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O ZnCl <sub>2</sub> CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	185 mg/L 415 mg/L 3 mg/L 1.5 mg/L 0.01 mg/L 7 mg/L	185 µg/L 415 µg/L 3 µg/L 1.5 µg/L 0.01 µg/L 7 µg/L
Otopina 4	NaHCO <sub>3</sub>	50 g/L	50 mg/L

### 2.6.2. Tijek biotesta

#### Priprema stanica

Sterilna tikvica od 250 mL je u sterilnom kabinetu napunjena s 50 mL GM medija za rast stanica algi na koji je zatim nacijepljeno 2 mL algi iz prethodno uzgojene temeljne kulture. Kako bi dosegle eksponencijalnu fazu rasta alge su ostavljene 72 sata u posebnom inkubatoru pri sobnoj temperaturi ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i pod svjetlom intenziteta od  $60\text{--}120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### Brojanje, nasađivanje i ekspozicija algi uzorcima ekstrakata i kontrola

Umnožene stanice su potom izbrojene u hemocitometru pod fazno – kontrastnim mikroskopom i brojnost stanica je izračunata sljedećom formulom:

$$C = n \times 10^4$$

C.....koncentracija stanica (broj stanica / ml)

n.....srednja vrijednost broja stanica po kvadratu

Volumen stanične suspenzije koju smo razrijedili do konačnog volumena izračunali smo putem izraza:

$$V_s = \frac{C_a \times V}{C}$$

$C_a$ .....broj željenih stanica ( $0,5 \times 10^4$  st) / ml

$C$ .....broj izmjerenih stanica / ml

$V_s$ .....volumen stanične suspenzije (ml)

$V$ .....konačni volumen medija (ml)

Nakon utvrđivanja broja stanica na mikroploču s pomoću 8 – kanalne mikropipete nasađene stanice u gustoći od 1000 stanica /200  $\mu$ L GM medija ( $0,5 \times 10^4$  st/mL) u 60 jamica (60 od 96 dostupnih na mikroploči). Rubne stanice su ispunjene samo s 200  $\mu$ L GM medija za rast algi.

Serijska razrjeđenja ekstrakata i kontrola su napravljena na posebnoj mikroploči u dva replikata i deset različitih koncentracija za ekstrakte i pozitivnu kontrolu ( $K_2Cr_2O_7$ ) dok se negativna kontrola sastojala od samo dvije jamice ispunjene s 200  $\mu$ L GM hranjivog medija. Čistoj mikroploči je dodan prethodno izračunat volumen GM medija (**Tablica 4**), najvećim koncentracijama je zatim dodana početna vrijednost ekstrakata iz kojih su serijski razrijeđene ostale koncentracije od najveće prema najmanjoj.

Zatim je 100  $\mu$ L GM medija izvađeno iz mikroploče sa stanicama i ubačeno 100  $\mu$ L prethodno pripremljenog razrjeđenja u svaku jamicu sa stanicama, od najmanje koncentracije prema najvećoj i na Tecan čitaču za mikroploče je izmjerena fluorescencija pigmenata klorofila *a* pri određenim valnim duljinama ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 440/680$  nm) koja je u kasnijim izračunima poslužila kao početna točka.

### **Mjerenje gustoće naraslih stanica algi**

Nakon što su stanice ostavljene na 72h u inkubatoru u istim uvjetima u kojima su bile uzgajane, ponovljeno je identično mjerenje fluorescencije klorofila *a* spomenuto u prethodnom ulomku.

**2.6.3. Analiza podataka**

Rezultati su izraženi kao koncentracija ovisna o postotku rasta algi, koji su izračunati iz dobivenih duplikata sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom. Srednja vrijednost i standardna devijacija su dobivene iz fluorescentnih vrijednosti duplikata. Zatim je izračunat specifični rast algi pomoću srednjih vrijednosti brojnosti stanica u određenoj vremenskoj točki pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\mu = \frac{\ln N_{96} - \ln N_0}{t_{96} - t_0},$$

$\mu$ .....specifični rast

$N_0$ .....brojnost stanica na početku izlaganja uzorcima

$t_0$ .....početna točka vremena izloženosti uzorcima

$N_{96}$ .....brojnost stanica nakon izloženosti od 96 h

$t_{96}$ .....vrijeme izloženosti uzorcima od 96 h

Serijska razrjeđenja su bila logaritmirana prije statističke analize i ne linearnom regresivnom metodom je dobivena sigomidalna krivulja za LC50 vrijednosti. Svi podatci i izračuni, dobiveni iz mjerenja, su obrađeni u Microsoft Office Excel-u 2010 i statistička analiza je napravljena u GraphPad Prism 5 programu za Windows operativni sustav. Rezultati su prikazani kao postotak preživljavanja sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom i linijama 95% pouzdanosti podataka dobivenih iz duplikata.

**Tablica 4.** razrjeđenja za ekstrakte *C. taxifolia*, *C. racemosa* i kalijev bikromat.

Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. taxifolia</i> )	Volumen medija (µL)
1:300	100	2	289
1:500	60	171	114
1:1000	30	165	165
1:1500	20	210	105
1:2000	15	196	65
1:4000	7,5	141	141
1:6000	5	162	81
1:10000	3	122	82
1:20000	1,5	84	84
1:50000	0,6	48	72
Razrjeđenje (2x)	Koncentracija (µg/mL)	Volumen (µL) ( <i>C. racemosa</i> )	Volumen medija (µL)
1:100	85	16	266
1:200	42,5	162	162
1:300	28,3	204	102
1:500	17	187	124
1:750	11,3	191	96
1:1000	8,5	167	56
1:2000	4,25	102	102
1:5000	1,7	84	126
1:10000	0,85	90	90
1:20000	0,43	60	60
Razrjeđenje (2x) (mg/mL)	Volumen K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (µL)	Volumen medija (µL)	
3,6	27	341	
2,3	248	140	
1,6	267	117	
1,3	264	61	
1	205	62	
0,72	147	57	
0,36	84	84	
0,1	49	127	
0,036	55	98	
0,01	33	87	

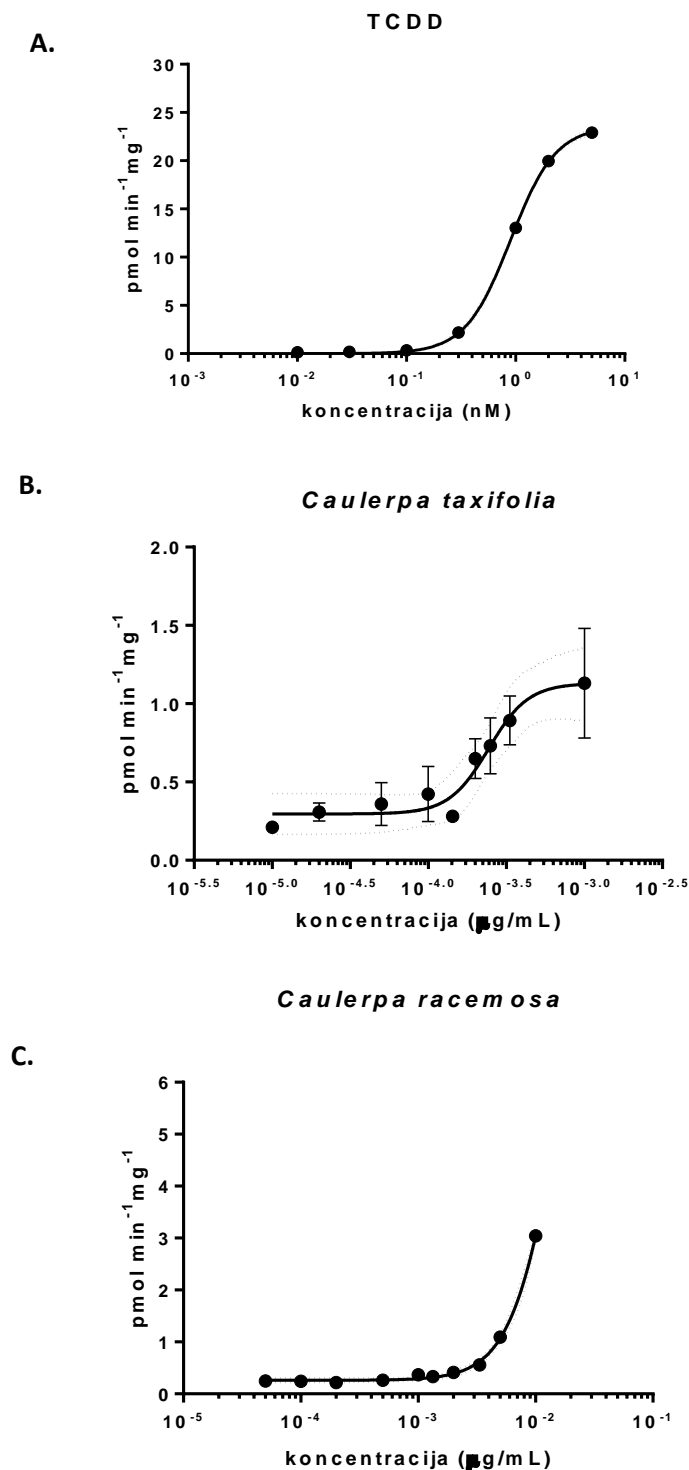
### **3. REZULTATI**

#### **3.1. Indukcija CYP1A1 enzima (EROD test)**

Indukcija CYP1A1 enzima u PLHC stanicama bila je zamjetna pri izlaganju testiranim ekstraktima, pri čemu je kroz deset minuta reakcije maksimalna koncentracija rezorufina postigla vrijednosti od 3,04 pmol/min/mg za *C. racemosa* i 1,37 pmol/min/mg za *C. taxifolia* (**Slika 10B i C**). Vrijednosti smrtnosti od 50 % stanica (LC50) su iznosile 7,308 µg/mL za *C. taxifolia* i 149,35 µg/mL za *C. racemosa*.

Pozitivna kontrola PLHC stanica izlagana modelnom induceru CYP1A1 enzima TCDD, pokazala je očekivani odgovor, s najvećom aktivacijom CYP1A1 od 23 pmol/min/mg i LC50 od 0,8994 nM (**Slika 10A**).

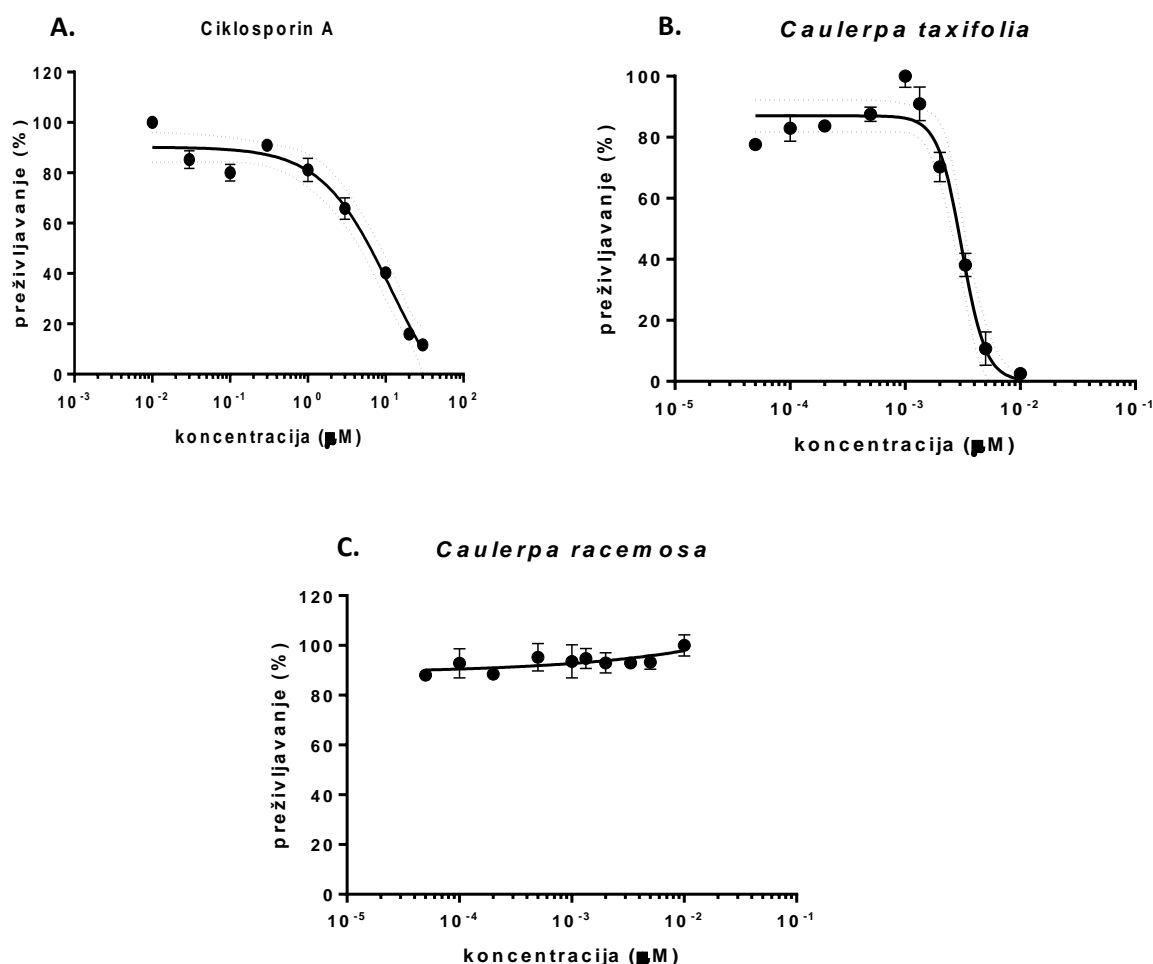




**Slika 10.** Sigmoidalne doza-odgovor krivulje indukcije etoksirezorufin – O – deetilaze u PLHC-1/wt stanicama izloženima ekstraktima algi roda *Caulerpa*. Graf **A.** prikazuje učinak pozitivne kontrole TCDD-a, graf **B.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. taxifolia* i graf **C.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. racemosa*. Krivulje prikazuju produkciju rezorufina, fluorescentnog produkta enzimske reakcije, ovisno o koncentraciji koja je prikazana u logaritamskom obliku. Točke su prikazane sa standardnim devijacijama, a crkana linija predstavlja područje 95 % pouzdanosti podataka.

### 3.2. Akutni toksični potencijal (MTT test)

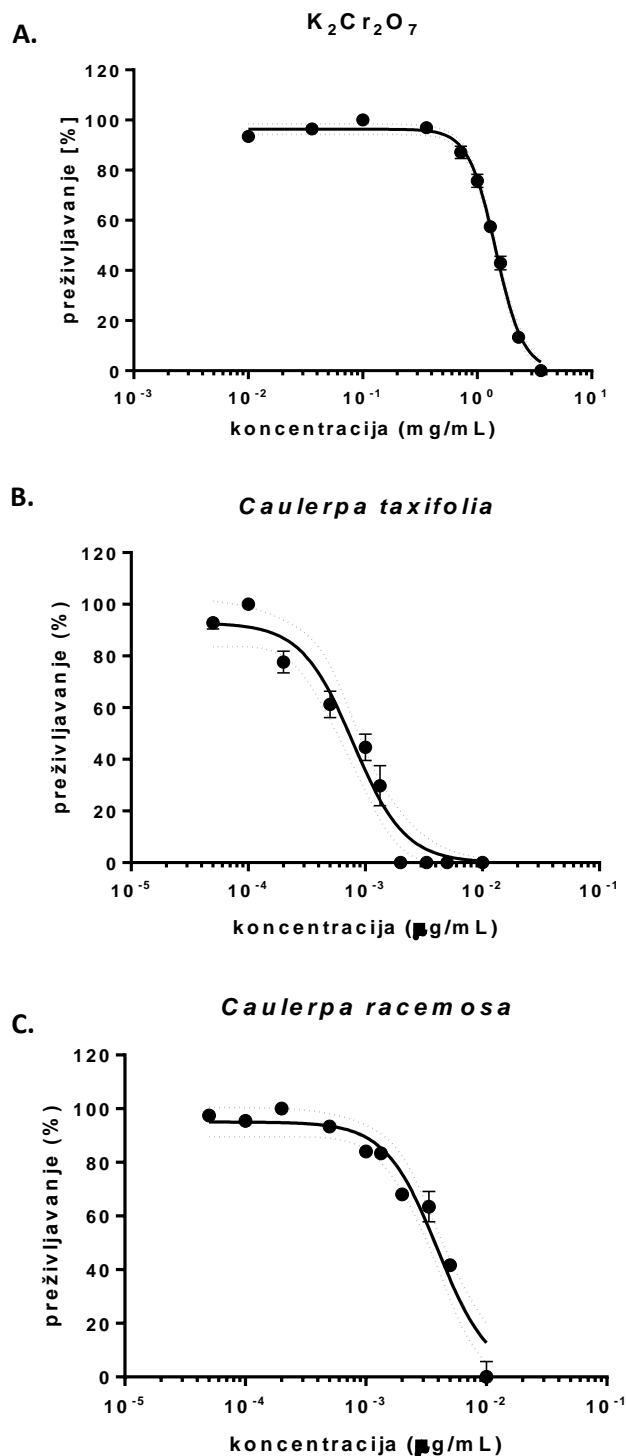
Biotransformacija formazana iz monotetrazolijske soli je u prisustvu ekstrakata *C. taxifolia* bila zabilježena u manjoj količini nego kod stanica izloženih *C. racemosa* ekstraktu, što je ukazalo na veću smrtnost, odnosno manje preživljavanje stanica koje su sposobne vršiti biotransformaciju. Krivulja preživljavanja pozitivne kontrole nam je potvrdila da su stanice korištene u biotestu bile sposobne reagirati na utjecaj toksikanata, kao što se vidi na primjeru modelnog toksičnog spoja ciklosporina A, na kojoj je zabilježen LC50 od 11.58  $\mu\text{M}$  (Slika 11A). Ekstrakt izoliran iz alge vrste *C. taxifolia* (Slika 11B) pokazao je jasan akutni citotoksični učinak. Vrijednosti koncentracije pri kojoj je zabilježena smrtnost od 50 % stanica (LC50) su zabilježene pri koncentraciji uzorka od 93,2  $\mu\text{M}$ . Za razliku od ovih rezultata, izlaganje stanica ekstraktu vrste *C. racemosa* nije rezultiralo značajnim smanjenjem preživljavanja PLHC stanica (Slika 11C).



**Slika 11.** Sigmoidalne doza-odgovor krivulje preživljavanja PLHC-wt/1 stanica nakon izlaganja ekstraktima algi roda *Caulerpa*. Na apscisi je prikazana koncentracija u  $\mu\text{M}$  u logaritmiranom obliku koja kod skupine pozitivne kontrole prikazuje koncentraciju u logaritmiranom obliku, dok ordinata prikazuje postotak vijabilnosti stanica. Graf **A.** prikazuje učinak pozitivne kontrole ciklosporina, graf **B.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. taxifolia* i graf **C.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. racemosa*. Krivulje prikazuju postotak preživljavanja stanica ovisno o koncentraciji. Crtkane linije prikazuju područje 95% pouzdanosti podataka, a točke mjerenja prikazuju raspon standardne devijacije.

### 3.3. Kronični toksični potencijal (AlgaeTox test)

Uzorci *S. subspicatus* jednostaničnih algi su u fazama eksponencijalnog rasta nakon izlaganja ekstraktima *C. taxifolia* i *C. racemosa* značajno smanjili intenzitet fluorescentnog signala pigmenta klorofila *a*, ukazujući da je došlo do značajne inhibicije rasta ovih jednostaničnih algi, odnosno značajne kronične toksičnosti. Pozitivna kontrola (kalijev bikromat) je letalnu koncentraciju od 50% (LC50) pokazala pri koncentraciji od 1,453 mg/mL (**Slika 12A**). Time je potvrđen standardni odgovor stanica na izlaganje modelnom toksikantu, odnosno normalno i očekivano funkcioniranje ovog testa kronične toksičnosti. Izabranih deset koncentracija (**Tablica 4**) testiranih ekstrakata rezultirale su jačim toksičnim učinkom za ekstrakt *C. taxifolia* u odnosu na uzorak ekstrakta *C. racemosa*. Ekstrakti *C. taxifolia* i *C. racemosa* su uzrokovali kroničnu toksičnost, pri čemu je dobivena LC50 vrijednost za *C. taxifolia* iznosila 23,6 µg/mL, odnosno za *C. racemosa* 118,35 µg/mL (**Slike 12B i C**).



**Slika 12.** Sigmoidalne doza-odgovor krivulje inhibicije rasta jednostaničnih algi vrste *Scenedesmus subspicatus* tijekom izlaganja seriji razrjeđenja ekstrakata roda *Caulerpa*. Graf **A.** prikazuje učinak pozitivne kontrole kalijeva bikromata, graf **B.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. taxifolia* i graf **C.** učinak razrjeđenja ekstrakta *C. racemosa*. Krivulje prikazuju postotak vijabilnosti stanica ovisno o koncentraciji, na apscisi je prikazana koncentracija u logaritmiranom obliku (mg/L, odnosno µg/L), a ordinata prikazuje postotak vijabilnosti stanica. Iscrtkane linije pokazuju područje 95 % pouzdanosti podataka, a točke mjerenja prikazuju standardne devijacije.

## 4. RASPRAVA

Svrha ovog rada bila je odrediti akutnu i kroničnu toksičnost ekstrakata algi roda *Caulerpa* te njihov potencijal indukcije staničnih detoksikacijskih enzima faze I. Uzorci testiranih algi su sakupljeni u Jadranskom moru u jesen 2013. god. u području Starog Grada na Hvaru za vrstu *C. taxifolia*, odnosno u zimu 2012. god. na području Vrsara za *C. racemosa*. Ispitan je njihov potencijalni kronični toksični utjecaj na preživljavanje jednostaničnih algi vrste *S. subspicatus* (AlgaeTox test) te akutna toksična učinak na preživljavanje hepatoma stanica riblje vrste *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1/wt) MTT testom. Indukcija CYP1A1 ovisnih monooksigenaza bila je određena EROD testom.

Odgovori stanica na ekstrakte *C. taxifolia* su zabilježeni u svim testovima, dok ekstrakt *C. racemosa* nije pokazao značajnu akutnu toksičnost pri MTT testu (**Slike 10, 11 i 12 te posebno 11C**).

Zbog različitih raspona koncentracija korištenih kod ekstrakata u EROD testu i različitim vrijednostima rezultata vijabilnosti u MTT testu akutne toksičnosti (**Tablice 1 i 2**), možemo zaključiti da neke vrste roda *Caulerpa* imaju izraženiji toksični potencijal. Povećani odgovor stanica na ekstrakte *C. taxifolia* je najvjerojatnije zabilježen zbog povećane proizvodnje primarnog sekundarnog metabolita kaulerpenina (CYN), koja je veća nego kod drugih vrsta istog roda, kao što je primjerice *C. racemosa* (Amade i Lemee, 1998).

Testovi preživljavanja temelje se na relativno lako ponovljivim pokusima kojima se s lakoćom mogu analizirati različiti tipovi uzoraka (pojedinačne tvari ili složeni uzorci) i generirati odgovarajući kvantitativni podaci. MTT testom se tako mjeri aktivnost mitohondrijskih enzima pomoću mjerenja nastalog formazana. Međutim, vrijeme izlaganja stanica je veoma bitno zbog aktivnosti staničnog metabolizma koji može biti vrlo različit dva sata nakon nasađivanja stanica u odnosu prema primjerice 48 sati izlaganja (Ferrari, 1990). No, bez obzira na stadij aktivnosti metabolizma stanica, *C. racemosa* ekstrakt je konzistentno davao slabiji toksični odgovor mjeren kao preživljavanje PLHC-1/wt stanica u MTT testu (**Slika 11C**). Pored manje proizvodnje kaulerpenina u odnosu na druge vrste istog roda, poput *C. taxifolia*, koncentracije sekundarnih metabolita kod roda *Caulerpa* također ovise i o godišnjem dobu i različitim dijelovima talusa koji su uzeti kao uzorak (Klein i Verlaque, 2008). Stoga, budući da je između prikupljanja uzoraka bio vremenski razmak od tri mjeseca, pored starosti samih uzoraka ovo je jedno od mogućih objašnjenja rezultata dobivenih za ekstrakt *C. racemosa*, koji je u svim testovima pokazao manju toksičnost od ekstrakta vrste *C. taxifolia*.

Pri izvođenju testova kronične toksičnosti koriste se različiti modelni organizmi, a dobiveni rezultati kreću se u relativno sličnim granicama osjetljivosti za iste taksonomske kategorije. Jedan od jednostavnijih testova kronične toksičnosti je AlgaeTox test, koji ujedno pokazuje veliku osjetljivost i visoku razinu standardizacije. Izlaganjem pokusnih algi (*S. subspicatus*) ispitivanim ekstraktima algi roda *Caulerpa* došlo je do smanjenja fluorescencije stanica i njihovih klorofila *a* koja je direktan rezultat pogoršanja njihovog fiziološkog zdravlja i smanjenja integriteta stanične membrane (Radix i sur, 2000). Rezultati dobiveni ovim biotestom (**Slika 12**) potvrđuju toksično djelovanje ekstrakata u svim testnim uzorcima u kojima je koncentracija ekstrakta bila dovoljno visoka.

Toksičnost ekstrakata algi roda *Caulerpa* velikim dijelom povezana je sa sadržajem kaulerpenina. Čisti uzorak kaulerpenina na živim stanicama može uzrokovati antiproliferativnu aktivnost bakterijskih kultura, inhibiciju rasta tumorskih stanica ljudskog porijekla, sprječavanje rasta

jajašaca morskih ježinaca, a također može utjecati i na aktivnost živčanih stanica beskralježnjaka (Mozzachiodi i sur, 2008). Ekstrakti algi koji su testirani u ovom istraživanju dobiveni su ekstrakcijom homogeniziranih dijelova listića i stabljiki, te nemaju niti približno tako visoku koncentraciju kaulerpenina usporedivu s koncentracijama koje su korištene pri drugim istraživanjima. Međutim, koncentracija kaulerpenina, a moguće i drugih toksičnih sekundarnih metabolita, bez sumnje je bila dovoljna da bi se uočio jasan citotoksični učinak na PLHC-1/wt stanice korištene u ovom istraživanju.

Značajan induksijski učinak zabilježen je u EROD testu, gdje su uzorci *C. taxifolia* i *C. racemosa* pokazali indukciju CYP1A detoksikacijskog enzima (**Slika 10**). Iako dobivene maksimalne aktivnosti pri EROD testovima mogu značajno varirati (Petrulis i Bunce, 1999), dobivene EC<sub>50</sub> vrijednosti bile su u sličnim rasponima (0,4 – 0,6 pmol/mg/min).

Prema drugim istraživanjima koja su provedena sa sličnim ekstraktima, primijećene su i sezonske varijacije u pohranjenim koncentracijama sekundarnih metabolita. Aktivnost detoksikacijskih enzima faze I. je ostala ista kroz cijelu godinu, osim za vrijeme ljeta i jeseni kada se drastično smanjila. Te promjene su najvjerojatnije povezane s promjenama temperature i metabolizmom algi koji se mijenja, odnosno prilagođava sezonskim promjenama (Lemee i sur, 1993). Pored različitih koncentracija sekundarnih metabolita ovisno o vrsti, to je još jedan potencijalni razlog različitih rezultata toksičnosti dobivenih za dvije testirane vrste algi roda *Caulerpa*.

Međutim, ekstrakti uzoraka testiranih u ovom istraživanju jasno su inducirali obrambeni odgovor stanica i mehanizme CYP1A1 ovisnih monooksigenaza, bez obzira na uvjete sakupljanja uzoraka, sezonalnost ili starost samih uzoraka. Time možemo pretpostaviti da je koncentracija kaulerpenina kao primarnog metabolita ovih algi, ali i drugih sekundarnih metabolita u razrijeđenim i homogeniziranim uzorcima listića i stabljika algi, bila i dalje dovoljno potentna nakon duljeg pohranjivanja u laboratoriju. Iako pri MTT testu ekstrakata vrste *C. racemosa* dobiveni odgovor nije bio statistički značajan, dobivanje značajnih rezultata u svim drugim testovima korištenim u ovom istraživanju potvrđuje toksični potencijal sekundarnih metabolita prisutnih u uzorcima invazivnih morskih algi roda *Caulerpa* koje nalazimo u Jadranskom moru.

## **5. ZAKLJUČAK**

Toksični učinak ekstrakata algi roda *Caulerpa* je zabilježen u EROD biotestu i AlgaTox biotestu na svim uzorcima, dok je djelomični odgovor bio zabilježen u MTT biotestu. Njihov utjecaj na živuće stanice, kao i kronična i akutna toksičnost su u ovom istraživanju ispitane biološki relevantnim, često korištenim i dobro standardiziranim biotestovima, na uzorcima koji su prikupljeni na mjestima prvog uočavanja algi obje vrste u Jadranskom moru te na sjevernom Jadranu, koji je ujedno njihova najsjevernija točka širenja. Poznavanjem učinka njihovih sekundarnih metabolita možemo bolje razumijeti njihov potencijalni učinak na ekosustave u kojima se nalaze kao invazivne vrste.

Ovi rezultati pokazali su jasan toksični potencijal sekundarnih metabolita algi roda *Caulerpa*, te ukazali na moguće mehanizme širenja ovih algi ispuštanjem sekundarnih metabolita koji mogu biti toksični za potencijalne konzumente i/ili druge vrste s kojima se ova alge natječu za isto stanište. Konačno, dobiveni rezultati ukazuju na značajnu biološku aktivnost ovih spojeva koju bi trebalo dalje istražiti, potencijalno i u biomedicinske svrhe.

## 6. LITERATURA

Anderson L.W.J. 2005. California's reaction to *Caulerpa taxifolia*: a model for invasive species rapid response. *Biological Invasions* **7**, 1003–1016.

Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1996. The Adriatic sea general circulation. Part I: air–sea interactions and water mass structure. *Journal of physical oceanography* **27**, 1492–1514.

Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1996. The Adriatic sea general circulation. Part II: baroclinic circulation structure. *Journal of physical oceanography* **27**, 1515–1532.

Artegiani A., Gacic M., Michelato A., Kovačević V., Russo A., Paschini E., Scarazzato P., Smirčić A. 1993. The Adriatic Sea hydrography and circulation in spring and autumn (1985 – 1987). *Deep – Sea Research II* **40**, 1143–1180.

Amade P., Leme'e R. 1998. Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. *Aquatic Toxicology* **43**, 287–300.

Barbier P., Guise S., Huitorel P., Amade P., Pesando D., Briand C., Peyrot V. 2001. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. *Life Sciences* **70**, 415–429.

Brüschweiler B. J., Würigler F. E., Fent K. 1995. Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC- 1 (*Poeciliopsis Lucida*). *Aquatic Toxicology* **32**, 143-160.

Collins P. J. 1985. Induction system of the polysubstrate monooxygenase of the native budworm *Heliothis Punctiger* (Wallengren) (Lepidoptera. Noctuidae). *Insect Biochemistry* **15**, 551–555.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N. G. 2000: Natural Products (Secondary Metabolites). U: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (ur.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* American Society of Plant Physiologists, 1251–1253.

David M., Gollasch S., Cabrini M., Perković M., Bošnjak D., Virgilio D. 2007. Results from the first ballast water sampling study in the Mediterranean Sea – the Port of Koper study. *Marine Pollution Bulletin* **54**, 53–65.

Djomo J.E., Dauta A., Ferrier V., Narbonne J.F., Monkiedje A., Njine T., Garrigues P. 2004. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Research* **38**, 1817–1821.

Dobretsov S., Dahms H.U., Harder T., Qian P. Y. 2006. Allelochemical defense against epibiosis in the macroalga *Caulerpa racemosa* var. *Turbinat*. *Marine Ecology Progress Series* **318**, 165–175.

Ferrari M., Fornasiero M. C., Isetta A. M. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods* **131**, 165–172.

Ferrer E., Garreta A. G., Ribera M. A. 1997. Effect of *Caulerpa taxifolia* on the productivity of two Mediterranean macrophytes. *Marine Ecology Progress Series* **149**, 279-287.



- Feyereisen R., Farnsworth D. E. 1985. Developmental changes of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in larval and adult *Diploptera Punctata*. *Insect Biochemistry* **15**, 755–76.
- Gacia E., Littler M. M., Littler D. S. 1996. The relationships between morphology and photosynthetic parameters within the polymorphic genus *Caulerpa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **204**, 209–224.
- Hahn M. E., Woodward B. L., Stegeman J. J., Kennedy S. W. 1996. Rapid assesment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: response to TCDD, TCDF, and two planar PCBs. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 582–591.
- Iveša Lj., Jaklin A., Devescovi M. 2006. Vegetation patterns and spontaneous regression of *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh in Malinska (Northern Adriatic, Croatia). *Aquatic Botany* **8**, 324–330.
- Klein J., Verlaque M. 2008. The *Caulerpa racemosa* invasion: A critical review. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 205–225.
- Kliebenstein D. J., Osbourn A. 2012. Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 415–423.
- Klotz A. V., Stegeman J. J., Walsh C. 1984. An Alternative 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase Activity Assay: A Continuous Visible Spectrophotometric Method for Measurement of Cytochrome P-450 Monooxygenase Activity. *Analytical Biochemistry* **140**, 138–145.
- Kobayashi Y., Hirano T., Omotehar T., Hashimoto R., Umemura Y., Yuasa H., Masuda N., Kubota N., Minami K., Yanai S., Ishihara-Sugano M., Mantani Y., Yokoyama T., Kitagawa H., Hoshi N. 2015. Immunohistochemical analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) toxicity on the developmental dentate gyrus and hippocampal fimbria in fetal mice. *Journal of Veterinary Medical Science* **77**, 1355–1361.
- Lemee R., Pesando D., Durand-Clement M. Dubreuil, A., Meinesz A., Guerriero A., Pietra F. 1993. Preliminary survey of toxicity of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced into the Mediterranean. *Journal of Applied Phycology* **5**, 485–493.
- Lyubenova M., Boteva S. 2016. Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems, Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum, Sonia Soloneski and Marcelo L. Larramendy, IntechOpen, DOI: 10.5772/64776. Available from: <https://www.intechopen.com/books/toxicology-new-aspects-to-this-scientific-conundrum/biotests-in-ecotoxicology-current-practice-and-problems>
- Lyons D. A., Scheibling R. E. 2009. Range expansion by invasive marine algae: rates and patterns of spread at a regional scale. *Diversity and Distributions* **15**, 762–775.
- Malvić T., Velić J., Cvetković M., Vekić M., Šapina M. 2015. Određivanje novih pliocenskih, pleistocenskih i holocenskih litostratigrafskih jedinica u hrvatskom dijelu Jadrana (priobalju). *Geoadria* **20**, 85–108.
- Mozzachiodi, Scuri R., Roberto M., Brunelli M. 2001. Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses afterhyperpolarization in invertebrate neurons. *Neuroscience* **107**, 519–526.

- Meinesz A., Belsher T., Thibaut T., Antolic B., Mustapha K. B., Boudouresque C. F., Chiaverini D., F. Cinelli, Cottalorda J. M., Djellouli A., El Abed A., Orestano C., Grau A. M., Ivesa Lj., Jaklin A., Langar H., Pascual E. M., Peirano A., Tunesi L., de Vaugelas J., Zavodnik N., Žuljević A. 2001. The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean. *Biological Invasions* **3**, 201–210.
- Meinesz A., Benichou L., Blachier J., Komatsu T., Lerneer R., Molenaar H., Mari X. 1995. Variations in the Structure, Morphology and Biomass of *Caulerpa taxifolia* in the Mediterranean Sea. *Botanica Marina* **38**, 499–508.
- Meyer K. D., Paul V. J. 1992. Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpales) and its effect on herbivorous fishes. *Marine Ecology Progress Series* **82**, 249–257.
- Namdeo A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* **1**, 1–11.
- Newman M.C. (2015): *Fundamentals of Ecotoxicology, The Science of pollution*, fourth edition. CRC press Taylor and Francis group LLC, Boca Raton.
- Nyholm N., Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 689–703.
- Orlić M., Gačić M., La Violette P. E. 1992. The currents and circulation of the Adriatic Sea. *Oceanologia Acta* **15**, 109–124.
- Pascual M., Peirano A., Tunesi L., Vaugelas J., Zavodnik N., Žuljević A. 2001. The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean, *Biological Invasions* **3**, 201–210.
- Petrulis J. R., Bunce N. J. 1999. Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds. *Toxicology Letters* **105**, 251–260.
- Piazzì L., Meinesz A., Verlaque M., Akcali B., Anotlić B., Argyrou M., Balata D., Ballesteros E., Calvo S., Cinelli F., Cirik S., Cossu A., D'Archino R., Djellouli A. S., Javel F., Lanfranco E., Mifsud C., Pala D., Panayotidis P., Peirano A., Pergent G., Petrocelli A., Ruitton S., Žuljević A., Ceccherelli G. 2005. Invasion of *Caulerpa racemosa* var. *Cylindracea* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea: an assessment of the spread. *Cryptogamic Algologie* **26**, 189–202.
- Pikelj K., Juračić M. 2013. Eastern Adriatic Coast (EAC): Geomorphology and Coastal Vulnerability of a Karstic Coast. *Journal of Coastal Research* **29**, 944–957.
- Radix P., Leonard M., Papantoniou C., Roman G., Saouter E., Gallotti-Schmitt S., Thiebaud H., Vasseur P. 2000. Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental safety* **47**, 186–194.
- Raniello R., Mollo E., Lorenti M., Gavagnin M., Buia M. C. 2007. Phytotoxic activity of caulerpenyne from the Mediterranean invasive variety of *Caulerpa racemosa*: a potential allelochemical. *Biological Invasions* **9**, 361–368.
- Ribera A. E., Zuniga G. 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **12**, 893–911.

Sfecci E., Le Quemener C., Lacour T., Massi L., Amade P., Audo G., Mehiri M. 2017. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia*: A comparative study between CPC and classical chromatographic techniques. *Phytochemistry letters* **20**, 406–409.

Stewart R. H. (2000): Introduction to physical oceanography, Department of Oceanography Texas A & M University

Sureda A., Box A., Deudero S., Pons A. 2009. Reciprocal effects of caulerpenyne and intense herbivorism on the antioxidant response of *Bittium reticulatum* and *Caulerpa taxifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 795–801.

Vaugleas J., Meinesz A., Antolić B., Ballesteros E., Belsher T., Cassar N., Ceccherelli G., Cinelli F., Cottalorda J. M., Orestano C. F., Grau A. M., Jaklin A., Morucci C., Relini M., Sandulli R., Span A., Tripaldi G., Klaveren P., Zavodnik N., Žuljević A. 1998. Standardization proposal for the mapping of *Caulerpa taxifolia* expansion in the Mediterranean Sea. *Oceanologia Acta* **22**, 85–94.

Velić J., Malvić T., Cvetković M., Velić I. 2015. Stratigraphy and petroleum geology of the Croatian part of the Adriatic Basin. *Journal of Petroleum Geology* **38**, 281–300.

Vidal J. P., Laurent D., Kabore S. A., Rechencq E., Boucard M., Girard J. P., Escale R., Rossi J. C. 1984. Caulerpin, Caulerpicin, *Caulerpa scalpelliformis*: Comparative Acute Toxicity Study. *Botanica Marina* **27**, 533-537.

Zaja R., Caminada D., Lončar J., Fent K., Smital T. 2008. Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **227**, 207–218.

Zavatarelli M., Raicich F., Bregant D., Russo A., Artegiani A. 1998. Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea. *Journal of Marine Systems* **18**, 227–263.

West E. J., West R. J. 2007. Growth and survival of the invasive alga, *Caulerpa taxifolia*, in different salinities and temperatures: implications for coastal lake management. *Hydrobiologia* **577**, 8

## **Životopis**

Rođen sam 23.06.1994. u Zagrebu gdje sam pohađao OŠ. dr. Ante Starčević. Nakon završetka osnovne škole 2009. godine, upisao sam dvojezični smjer X. opće gimnazije „Ivan Supek“ i 2013. završio srednjoškolsko obrazovanje, te se upisao na preddiplomski smjer Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završetkom preddiplomskog studija 2016. godine sam obrazovanje nastavio na Diplomskom studiju Znanosti o okolišu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.